

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170410001

http://www.yykxjz.cn/

曹丹丹, 刘金相, 王志刚, 张全启, 齐洁, 王旭波, 于海洋. 牙鲆 *NOD2* 基因的表达分析及在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 53-64

Cao DD, Liu JX, Wang ZG, Zhang QQ, Qi J, Wang XB, Yu HY. Expression analysis and functional characterization of *NOD2* in the resistance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Edwardsiella tarda* infection. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 53-64

牙鲆 *NOD2* 基因的表达分析及 在抗迟缓爱德华氏菌感染过程中的功能*

曹丹丹 刘金相 王志刚 张全启 齐洁 王旭波 于海洋^①

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 本研究利用实验室已建牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)转录组数据库预测得到牙鲆 *NOD2* 基因(*PoNOD2*), 并利用 PCR 技术进行序列验证。同时, 设计迟缓爱德华氏菌注射感染牙鲆成鱼和体外免疫刺激牙鲆鳃细胞系实验, 探究 *PoNOD2* 基因在抗菌免疫反应中的作用。*PoNOD2* 基因的开放阅读框长度为 2964 bp, 编码 988 个氨基酸。*PoNOD2* 蛋白有 3 种保守结构域, 包括 C-末端 LRR, 中心 NACHT 和 N-末端 CARD 结构域。实时荧光定量 PCR 结果显示, 在所检测牙鲆组织中, 迟缓爱德华氏菌的侵染能显著上调 *PoNOD2* 的表达。体外免疫刺激牙鲆鳃细胞系实验显示, 在 PGN、Poly I : C 和迟缓爱德华氏菌刺激下, *PoNOD2* 表达上调。亚细胞定位显示, *PoNOD2* 蛋白定位于牙鲆鳃细胞的细胞质中。在迟缓爱德华氏菌侵染牙鲆鳃细胞过程中, *PoNOD2* 基因的过表达能够抑制细菌生长, 并引起 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等炎性细胞因子的表达上调。结果表明, *PoNOD2* 在抑制迟缓爱德华氏菌生长以及调节牙鲆对病原菌的免疫应答中发挥重要作用。

关键词 牙鲆; 模式识别受体; *NOD2*; 迟缓爱德华氏菌; 牙鲆鳃细胞系
中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0053-12

先天免疫系统是生物体抵抗病原微生物侵害的第一道防线, 它通过模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR)识别多种病原相关分子模式(Pathogen associated molecule pattern, PAMP)并传递信号启动免疫防御反应(Janeway, 2002)。NLRs(NOD 样受体家族)是一类重要的 PRR, 主要识别细胞浆内的 PAMP (Inohara, 2003; Franchi *et al*, 2009)。*NOD2*(又称作 CARD15)基因是 NLR 受体家族重要的成员之一, *NOD2* 蛋白具有 3 个结构域: N 端有 2 个连续的 CARD

结构域, C 端是 LRR 结构域, 中间是保守性最强的 NOD 结构域(Imagawa *et al*, 1991)。

在哺乳动物中, *NOD2* 被证实能够特异识别肽聚糖(PGN)的降解产物胞壁酰二肽(MDP) (Girardin *et al*, 2003), 在识别到配体 MDP 的基础上, *NOD2* 利用 CARD-CARD 相互作用招募 RIP2(Bertin *et al*, 1999; Ogura *et al*, 2001), 通过一系列酶联反应激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路, 包括 p38、ERK(Extracellular signal-regulated protein kinase)和 JNK(c-Jun N-terminal

* 国家自然科学基金(31101891)和国家 863 高技术计划(2012AA10A408)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31101891), and the National High Technology Development Program of China (863) (2012AA10A408)]. 曹丹丹, E-mail: caodandan222@163.com

^① 通讯作者: 于海洋, 副教授, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2017-04-10, 收修改稿日期: 2017-04-21

kinase)信号通路等(McCarthy *et al.*, 1998; Navas *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001)。在部分硬骨鱼类中, *NOD2* 基因已被克隆并进行功能探究, 比如斑马鱼(*Danio rerio*)(Maharana *et al.*, 2015)、印度鲮鱼(*Cirrhinus mrigala*) (Swain *et al.*, 2013)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Chang *et al.*, 2011)等, 生物信息学分析证明, *NOD2* 在硬骨鱼中保守性很高。在斑马鱼中, *NOD2* 的基因沉默会削弱斑马鱼幼鱼抵抗病原微生物感染和控制全身感染的能力(Zou *et al.*, 2016)。在虹鳟中, 过表达 *NOD2* 有效结构域的表达基因, 能够诱导 IL-1 β 等促炎症细胞因子的产生, 并且增强 IFN- β 等抗病毒因子的表达(Chang *et al.*, 2011)。Zou 等(2016)对斑马鱼 *NOD2* 的结构域进行了详细研究, 发现 CARD 和 NACHT 结构域是 *NOD2* 激活 NF- κ B 信号通路的结构基础, 而具备 LRR 和 NACHT 结构域时, *NOD2* 对 IFN 具有激活活性。总之, 鱼类 *NOD2* 广泛参与抗菌、抗病毒的炎症反应, 其反应机制有待进一步探究。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国重要的海水养殖鱼类, 随着养殖规模的扩大, 其病害防御问题也引起关注。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是一类人畜共患菌, 能够侵害各种脊椎动物, 包括从低等的鱼类到高等哺乳类(Okuda *et al.*, 2006)。作为胞内菌, 迟缓爱德华氏菌侵染生物机体后, 会在细胞内发生内化并大量繁殖。因为有细胞膜的保护, 胞内的迟缓爱德华氏菌会避开体液中溶菌酶的溶解作用以及吞噬细胞的吞噬作用等, 引起鱼类出现皮肤损伤、肠道积水、多种内脏器官的脓肿出血等, 并产生严重的消化道炎症反应, 最终导致鱼体死亡(Srinivasa Rao *et al.*, 2001)。在以往报道中, 迟缓爱德华氏菌会使牙鲆、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等鲆鲽鱼类产生严重病害, 出现大量致死的病例(Ling *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2007)。因此, 本研究进行了迟缓爱德华氏菌牙鲆体内攻毒以及牙鲆鳃细胞系的迟缓爱德华氏菌免疫刺激实验, 从体内和体外两方面对 *PoNOD2* 进行表达和功能分析, 探究 *PoNOD2* 在抗病原菌侵染方面的作用, 将为牙鲆的抗病原菌侵染机理提供理论基础, 为牙鲆的抗病育种提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牙鲆 本实验所用牙鲆体长为 20~22 cm, 来源于山东省黄海水产有限公司, 实验前, 置于充气海水中, 22 $^{\circ}$ C 暂养 7 d。实验期间, 所有实验材料均按

照中国海洋大学动物管理与使用委员会(OUC-IACUC)相关规定进行处理和使用。

1.1.2 牙鲆鳃细胞系 (FG9307) 牙鲆鳃细胞系 (FG9307)来源于中国海洋大学细胞工程技术实验室。该细胞用 DMEM 培养基培养, 加入 10% (v/v) FBS (Fetal bovine serum), 1% (v/v) NEAA, 和 100 U/ml Penicillin, 24 $^{\circ}$ C 培养。

1.1.3 迟缓爱德华氏菌 实验所用迟缓爱德华氏菌菌株来自于中国海洋大学海洋微生物研究中心。将该菌株划线接种于 LB 固体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 活化培养 12 h。活化后将单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇晃培养 12 h。用 PBS 缓冲液稀释使其终浓度为 10 7 CFU/ml。

1.2 方法

1.2.1 获得 *PoNOD2* 核心片段序列 在 NCBI 和 Ensembl 两个数据库搜取可获得的硬骨鱼 *NOD2* 同源序列, 包括斑马鱼 *NOD2* 和青鳉(*Oryzias latipes*) *NOD2*。将 2 条序列与实验室已建转录组数据库进行同源比对, 得到 *PoNOD2* 基因的 cDNA 序列, 根据比对结果设计扩增 *PoNOD2* ORF 序列的特异性引物 *NOD2*-ORF-FW/RV(表 1), 利用 PCR 技术克隆验证。

1.2.2 *PoNOD2* 基因序列分析 利用 SMART 预测 *PoNOD2* 的蛋白结构域, 同时利用 DNAMAN 对 *PoNOD2* 的氨基酸和核酸进行序列比对。通过 NCBI 和 Ensembl 两个数据库得到尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、斑马鱼、家犬(*Canis lupus familiaris*)、老鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)*NOD2* 的氨基酸序列, 利用 MEGALIGN 和 DNASTAR 对牙鲆与上述 5 个物种的氨基酸序列进行分析, 观察 *NOD2* 蛋白结构域在各个物种间的保守性。为了探究 *NOD2* 在硬骨鱼与其他脊椎动物之间的进化关系, 从 NCBI 和 Ensembl 中获得多个物种 *NOD2* 的氨基酸序列(表 2), 利用邻位相连法(Neighbor-Joining)对 *NOD2* 蛋白进行系统进化分析, 利用 MEGA 6 构建进化树。

1.2.3 *PoNOD2* 组织表达分析 本实验所用组织表达分析的定量 cDNA 模板是 3 条雌鱼和 3 条雄鱼的混合模板, 每条鱼都经过麻醉后解剖, 取心、肝、脾、肾、脑、鳃、肌、肠 8 个组织。

1.2.4 牙鲆 p-EGFP-*NOD2* 质粒构建 为了深入探究 *PoNOD2* 基因的功能, 在 *PoNOD2* 基因的 ORF 两端, 即 ATG 处和 TAG 处分别利用引物 *NOD2*-Fw2 和 *NOD2*-Rv2 设计 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点。通过双酶切得到 *PoNOD2* 的 ORF 克隆片段, 连接到 p-EGFP-C1 质粒中, 得到 p-EGFP-*NOD2* 重组质粒。

表 1 实验所用引物
Tab.1 Primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
NOD2-Fw1	AGTGCCTAAAGGACAGATGG	Degenerate PCR
NOD2-Rv1	ACAGTCCCCTTTCAACTTAATG	Degenerate PCR
NOD2-RT-Fw	TTCCTCTCTCTAAGGCTGGGTAA	qRT-PCR
NOD2-RT-Rv	TTACCTACCAGGCTAAACCAAGTC	qRT-PCR
NOD2-Fw2	CCGCTCGAGGGATGGATCAGCGAGAAGAAGCC	Plasmid construction
NOD2-Rv2	CGGGGTACCTCAGTGAAGAGCAGCCTCTTC	Plasmid construction
IL-1 β -Fw	CAGCAACCGCAAAGTTCTTC	qRT-PCR
IL-1 β -Rv	AATCGCACCATCTCACTGTC	qRT-PCR
IL-6-Fw	CTCCGCAATGGGAAGGTG	qRT-PCR
IL-6-Rv	GATGGATGGGTGGAATAA	qRT-PCR
IL-8-Fw	TACCACTGACGGGTCAAAGT	qRT-PCR
IL-8-Rv	TACTTTTGACTGGGGGTTC	qRT-PCR
β -actin-Fw	GGTATCCTGACCCTGAAGTA	qRT-PCR
β -actin-Rv	CTTCTCCCTGTTGGCTTTAG	qRT-PCR

表 2 实验所用 *NOD2* 基因编号
Tab.2 *NOD2* sequences used in the study

物种名 Common Name	拉丁名 Latin Name	编号 Accession No.
斑马鱼 Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	ENSDART00000148805
青鳉 Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	XM_004067440.2
尼罗罗非鱼 Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003437543.4
红鳍东方鲀 Fugu rubripes	<i>Takifugu rubripes</i>	XM_011609669.1
小鼠 Mouse	<i>Mus musculus</i>	AH012203.2
人 Human	<i>Homo sapiens</i>	ENST00000526417
兔 Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	XM_008275044.2
猪 Pig	<i>Sus scrofa domestica</i>	NM_001105295.1
牛 Cow	<i>Bos taurus</i>	NM_001002889.1
马 Horse	<i>Equus caballus</i>	XM_014738410.1
新月鱼 Platyfish	<i>Xiphophorus maculatus</i>	XM_005796118.1
斑点叉尾鲷 Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	XM_017459333.1
露斯塔野鲮 Labeo	<i>Labeo rohita</i>	JF923468.1
鸭嘴兽 Duckmole	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XM_001519888.2
非洲象 African elephants	<i>Loxodonta africana</i>	XM_010596088.1
家犬 Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	ENSCAFT00000015589
草鱼 Grass carp	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	FJ937973.1
大鼠 Brown rat	<i>Rattus norvegicus</i>	NM_001106172.1
普通猕猴 Tcheli macaque	<i>Macaca mulatta</i>	XM_015126107.1
黑猩猩 Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	NM_001105240.2
虹鳟 Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001201555.1

1.2.5 迟缓爱德华氏菌刺激实验 取 224 条生长状态良好的牙鲈, 分为空白对照组(4 条)、对照组(130 条)和实验组(90 条)。空白对照组牙鲈不做处理, 对照组牙鲈腹腔注射 1 ml PBS, 实验组腹腔注射 1 ml 浓度为 10^7 CFU/ml 的迟缓爱德华氏菌菌液。随后将

注射组和对照组分开暂养, 在刺激 1、3、5、8、12、24、48、72、96 和 110 h 时取样。每个时间点, 空白对照组(1 h 时取)、对照组和实验组分别取 4 条鱼, 经麻醉后解剖, 取鳃、肾和脾。组织存于液氮中, -80°C 保存待用。

1.2.6 免疫刺激实验 将状态良好、单层培养的牙鲆鳃细胞系接板到 12 孔板,待 24 h 后细胞覆盖度达到 90%~95%,汇集成单层。向每个孔中加入 PGN, Poly I:C 和迟缓爱德华氏菌菌液,使终浓度分别为 50 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 和 5×10^6 CFU/ml。对照组加入相同浓度的 PBS。分别在刺激后 0、1、2、4、8 和 12 h 时,收集细胞样品,存于 Trizol 中待用。

1.2.7 细胞转染 将状态良好的牙鲆鳃细胞系接板到 12 孔板,待细胞覆盖度达到 90%左右。吸走培养基, PBS 清洗 2 遍后,换上新鲜 DMEM 培养基,用 Lipofectamine™ 3000 进行 p-EGFP-PoNOD2 的质粒转染,操作步骤严格按照说明书。对照组转染 p-EGFP-C1 质粒。转染 48 h 后,将实验组和对照组细胞分别用 PBS 清洗 3 次,4% PFA 固定 10 min, PBS 再清洗 3 次。在每孔中加入 DAPI 染液,使作用浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$, 10 min 后用 PBS 清洗 3 次,激光共聚焦显微镜(Nikon A1R)下观察拍照。

1.2.8 抗菌检测实验 将转染 p-EGFP-NOD2 质粒 24 h 以后的牙鲆鳃细胞,用 800 $\mu\text{g/ml}$ 的 G418 进行阳性细胞筛选,得到 PoNOD2 过表达鳃细胞。对照组转染 p-EGFP-C1 质粒。用迟缓爱德华氏菌对鳃细胞进行侵染,菌落数与细胞比例(MOI)为 10:1。在侵染 4 h 以后,迟缓爱德华氏菌侵染到胞内,用新鲜培养基缓缓清洗细胞 3 次,尽量洗净胞外细菌。之后用含有 200 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基继续培养细胞 2 h,胞外未侵染进细胞的迟缓爱德华氏菌已被杀死。用新鲜培养基清洗细胞 3 次,换上正常 DMEM 继续培养细胞 15 h,此时,胞内的迟缓爱德华氏菌会在细胞内正常生存、繁殖。此后,用正常培养基继续培养,在 6 h 和 15 h,分别用胰酶消化细胞,EP 管收集离心,取沉淀。PBS 清洗沉淀 3 次后,用 1% Triton X-100 裂解细胞 10 min,梯度稀释细胞裂解液,涂 LB 固体培养基板,计数。

1.2.9 免疫调节检测实验 将转染 p-EGFP-NOD2 质粒 48 h 以后的牙鲆鳃细胞,用 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 PGN 进行刺激,对照组用 PBS 处理。在刺激 24 h 以后,收集细胞样品,提取 RNA,用 qRT-PCR 检测 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的表达变化情况。

1.2.10 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 根据 PoNOD2 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物,选用 β -actin 作为内参基因。运用 Light Cycler 480 进行 qRT-PCR 扩增,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 40 个循环。实验中每个待测样品均设置 3 次重复,保证准确性。实验得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理数据,经计算得到 PoNOD2 的相对表达量。数据以

变化倍数呈现,代表实验组与对照组之间相对表达量的比值。所有定量引物序列均在表 1 中列出。

1.2.11 数据分析 本实验所涉及数据差异性分析,均利用 SPSS 20.0 软件,使用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较。所有数据以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)($n=3$)表示,各个组之间的差异性用*表示(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)。

2 结果

2.1 PoNOD2 的 ORF 序列扩增

以牙鲆混合组织为模板,扩增得到 PoNOD2 基因的 ORF 序列,与牙鲆转录组数据库中牙鲆 NOD2 ORF 序列完全一致。PoNOD2 的 ORF 长为 2964 bp,编码 988 个氨基酸。通过在线蛋白结构预测软件 SMART 分析发现, PoNOD2 的蛋白结构域与其他脊椎动物一样,包含 3 个典型结构域: CARD、NACHT 和 LRR(图 1)。利用 DNAMAN 对 PoNOD2 核酸序列与氨基酸序列比对分析(图 1),结果显示, PoNOD2 的 N 端的 2 个不连续 CARD 结构域,其位置分别在 1~93 bp、107~198 bp; 中间是 NACHT 结构域,其位置在 259~444 bp; C 端的多个 LRR 结构域,其位置在 737~979 bp。

2.2 氨基酸多序列比对与系统进化分析

在牙鲆、尼罗罗非鱼、斑马鱼、家犬、老鼠和 humans 中,氨基酸序列比对结果显示(图 2), NOD2 基因的 3 个结构域在脊椎动物中保守性很强,其中 NACHT 结构域最为保守。为了探究 NOD2 在脊椎动物中的进化关系,本研究利用 MEGA 6 构建了由不同脊椎动物的 NOD2 基因组成的系统进化树(图 3),鸭嘴兽(Ornithorhynchus anatinus)NOD2 被选为外类群,其中,鱼类和其他脊椎动物分别形成 2 个亚支。在鱼类亚支中,牙鲆与红鳍东方鲀(Takifugu rubripes)最为接近,它们与青鳞、虹鳟和新月鱼(Xiphophorus maculatus)组成一支,区别于由斑马鱼、草鱼(Ctenopharyngodon idella)、露斯塔野鲮(Labeo rohita)等组成的另外一支。

2.3 PoNOD2 的组织表达

如图 4 所示, PoNOD2 在脾中具有最高表达量,其次是肝,随后是肾、肌肉、鳃、心脏和脑。

2.4 PoNOD2 蛋白亚细胞定位

实验结果显示(图 5),牙鲆 NOD2 蛋白与其他脊椎动物蛋白一样,在细胞质中表达,从图 5 可以看出,牙鲆鳃细胞的细胞质(绿色)与细胞核(蓝色)界限分明。

```

1      TTTGGTGGTGGTGGTCTTGTCAACATAAGAGCTTTTCTATTTTGAAGAGATGAGACTGAATCCCTGTATTGTGATGTC
79     CACATGCATGCATGTGTCCAGTTGGTCTTGAAAGTGTATTTTCATTTGCGAGGCATCAATTTAGTTTCACTTTAACAAAA
157    GGGACATTTGTGCGCAGTACAAGTTTCGCTTTTCAGTTTGGAAATGAGGAAGAGGAAAAAGCCTTACATTTCAGTGCCTAAA
235    GGACAGATGGTGGGACTGGAAGCTTTGGCGCTGTGAAAACCTTAATGTACAAAATGAATGAAACTCGGGAGGAAAGGTA
313    GGAACAAGATGACATGTGATAGGTTGTGATACTGGAAGCAGCAGATGTTCTTGTGGACATCTTTAGAAAATGGAAGCA
391    GGCAGTCACAAGCATGTTTGCCAGGAAGTGTGCTGAAACAACGGACAGAGATACTGCATGCATGTGCAGCAGTGG
      M F A Q E L V L K Q R T E I L H A L C S S G
469    CTCAGCAGAACGTCTGGAAAGAGTTCTGGATCTACTGTTGGCCCAGGGGGAGCTTGTATGGGAGGAATACCGAACAAT
      S A E R L E R V L D L L L A Q G E L V W E E Y Q N I
547    ACAAGTACCAGGTAGAGCACTGTATACCAATGCCAGACACTTGTGACCTGGTTTACACGAAGGGTGTGGATACCTG
      Q V P G R A L Y T N A R H L L D L V Y T K G V D T C
625    TGAATTTTCTCACAGCTCTCAAAAAGGTTGTGCCAGAAGAGCAGGGGGCAGCACTCTCCTCCTCAGGAGGCTGTTT
      E I F L T A L K K V V P E E Q G A A L S S S G G C L
703    AGATCTCGAAAAGAAAGGAGCATGTCCAGAGCAGCGACCCAAACTCTTTTGATTGCTAGGCCAGCGCTCAGCGCAA
      D L E K K G A C Q S T A T Q T L L I R R P S L I G K
781    GCTACAAGACTGCATTGATGGTGTCTAGAGGCTCTGACTGTGTCCAGGAACTTCACCTCAGAAGACTGTGATGACAT
      L Q D C I D G A L E A L T V S G N F T S E D C D D I
859    ACGGCTTCATACACACCCCTCTCAGCAGCAAGATGTTTGTGATCATGTCCAGATCAGTGGGTGAGTCAGCGGC
      R L P I H T P S Q Q A R C L L D H V R S T Y G G T A A
937    AAAGGTGGTACTGCATTATATTTCAGCAGCAGGATCTGGAGCCTCACTGACCCAAGAGCAACTGACACCACAAAAGA
      K V V L H Y I Q Q Q G S G A S L T Q E Q L T P P K E
1015   GCTGTTAAAGTACCAGAAGAAGCTGAGCAGTTCTGTGTCTGCCAGTCTGTTTCTCAGTACTTATGGAGGGACCAG
      L L K Y Q K K L S S S V S A Q S C F L S T Y G G T S
1093   CCACATGTCCTTGGATGACATCTACTGAAGGCCAGCTGGAATTAGCTCATGACTGTCCTGATACACATGGACCTTT
      H M S L D D I Y T E G Q L E L A H D C P D T H G P L
1171   GGGCCTAGAGCACATAATTGGTGCAGTGGGTACAGTGAATGAGGAGGCTGACGCGGTGCTGGTGTCTGGTGGGGCGG
      G L E H I I G A V G T V N E E A D A V L V S G E A G
1249   CTGTGGGAAGAGCACCTACTCCAGAGGCTGCACTTGTCTGGGCTCGTGGGGCAGCCTTCCAGCACTTCTGCTTCT
      C G K S T L L Q R L H L L W A R G A A F Q H F L L L
1327   GTTCCATTTCAGTTGTGCGCAGTTGAACTCGGAGCAGCGGAACTGTCTGTCCAAGAGCTGTGTTTCAGATTGCTG
      F P F S C R R L N S E H R E L S V Q E L L F Q H C C
1405   CTGGCCAGCAGGAAGCAGGAGGAGATTTTCAATTACCTGGATCACCACATCTCATCTTTCATTTTCGATGG
      W P D R K Q E E I F Q F I L D H P H L I L F T G D G
1483   CCTGGATGAGCTCAAACAGAGCTTTTCAGACGAGCAGGCTCTGCTGCCCCACCCAGCGTGCACCTGTTTACATACT
      L D E L K Q S F S D E H R L C C P T Q R A P V H I L
1561   ATTATTCAACCTAATCCAAGGTTCACTAATGAAGGGGGTGTGGAAAGTGGTATCTAGTCGTCCAGATGTAGTGGGGCC
      L F N L I Q G S L M K G V W K V V S S R P D V G P
1639   TTTGCTGAGAAAACACCTTCGCAAAGAAGTCTTCTGAAAGGTTTTTCCCGAGTGGGATTATTGTTTTGTTAAGAA
      L L R K H L R K E V F L K G F S P S G I H C F V K K
1717   GCATCACAGTGACCCACAGTGGCTGCTAAGGTTTTGGAGTCCCTGCAGACAAAACAGCTTTACTTGGACTATGTCA
      H H S D P T V A A K V C L E S L Q T N T A L L G L L C H
1795   TAGTCCAGTTCTGCTGGATTGTGTACAGTCCATAAGGAGTTGCTGGGCTGCGGAGAGGGCAGTTTACAACAAAT
      S P V L C W I V S Q C H K E L L G C G E G S L Q T I
1873   CACAGACATTTACATGATGATCTTGCAGCACTTTTACAGCGCCGAAGCACCTGGAGAACCACATGGGGTTAGGTTG
      T D I Y M M I L Q H F L Q R R S T L E N T M G L G W
1951   GCTTCAGGAGCACCTAAAAACAGTCTTGAATCTAGGACAGCTTGCCTTTGATGGGATAGGAACCCTGTTATATCTT
      L Q E H L K T V L N L G Q L A F D G I G T Y C Y I F
2029   CTCATGTACAGATCTGAAGACATGTGGTGTGACTGAAAAGGATATATGTATGGGCTTCTCATTCAAAGCAAAGATAT
      S C T D L K T C G V T E K D I C M G F L I Q S K D M
2107   GTCCTCCGCCAACAGTAAACACTATGAATTCCTTCAATGTGACAATGCAGTGTTCCTTGTGCTCTGTACATTGTTTT
      S S A N S K H Y E F L H V T M Q C F F A A L Y I V L

```

图 1 *PoNOD2* 基因的核苷酸序列与氨基酸序列对应图

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *PoNOD2*

CARD、NACHT、LRR 结构域均用方框圈出, 各结构域名称在图片左侧标注

All structure domain amino acid residues are marked by boxes, the CARD, NACHT, and LRR are listed in the left

2.5 迟缓爱德华氏菌感染牙鲈中 *PoNOD2* 的表达

在迟缓爱德华氏菌感染牙鲈成体鱼的不同时期, 分别取了迟缓爱德华氏菌组和对照组的鳃、肾、脾组织, 探究 *PoNOD2* 在迟缓爱德华氏菌刺激下的表达, 结果显示, 在各个组织中, 迟缓爱德华氏菌的刺激能够引起 *PoNOD2* 不同程度表达上调。

在肾中(图 6A), 迟缓爱德华氏菌刺激后, *PoNOD2*

的表达呈现先升高后降低再升高再降低的趋势, 3 个升高点分别出现在 3、48 和 110 h, 在这 3 个时期, 实验组的 *PoNOD2* 表达量分别是对照组表达量的 2.6 倍、3.14 倍和 2.15 倍。在脾中(图 6B), 迟缓爱德华氏菌对 *PoNOD2* 的诱导作用随刺激时间的延长而升高, 到 96 h 时达到最高。在鳃中(图 6C), 迟缓爱德华氏菌从 5 h 开始对 *PoNOD2* 发挥诱导作用; 在 96 h 时, *NOD2* 的表达量达到最高, 是对照组的 3.27 倍。

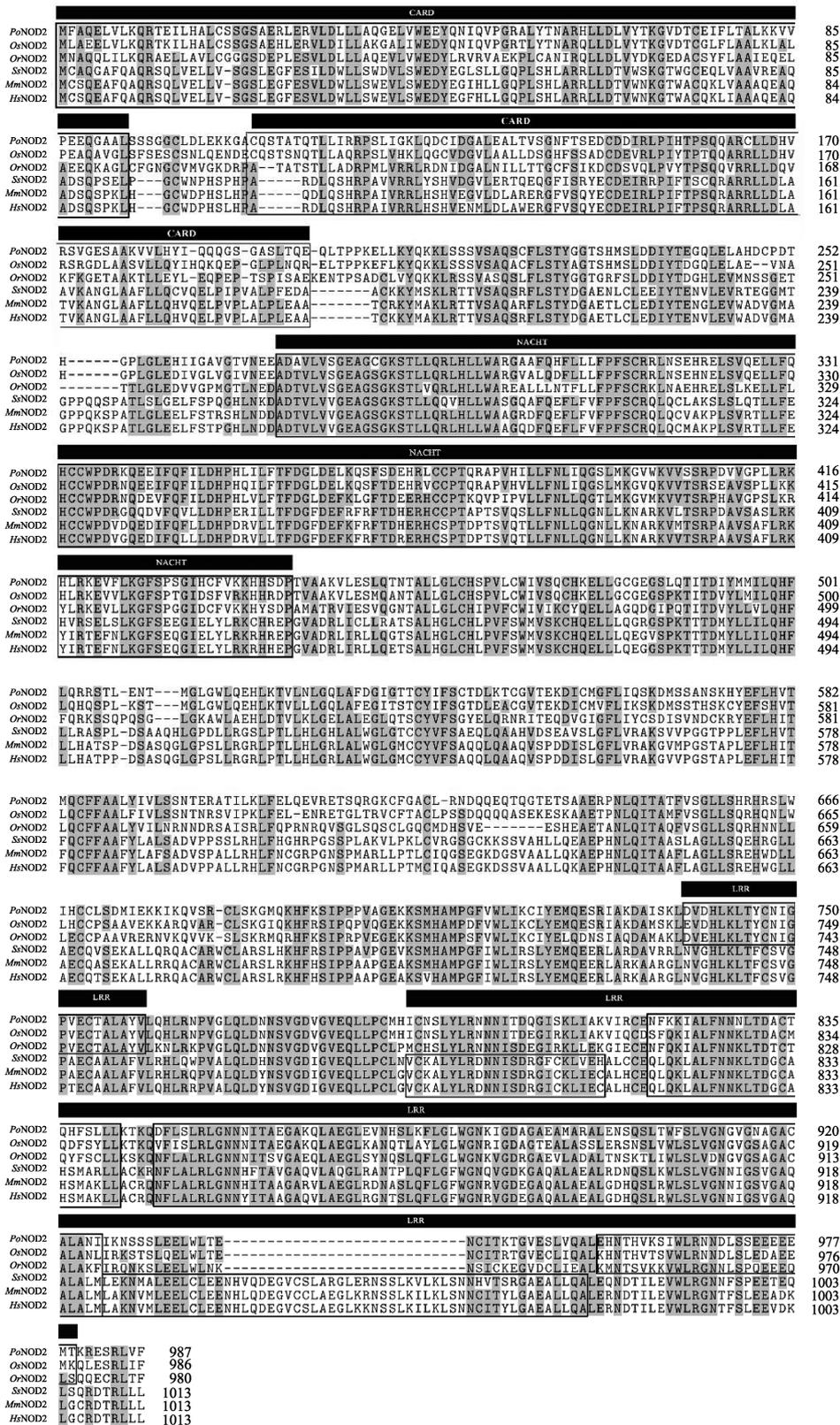


图 2 脊椎动物 NOD2 氨基酸多序列比对

Fig.2 The multiple alignment of NOD2 amino acid sequences in Japanese flounder and other species

相同的氨基酸以中等灰度着色。CARD、NACHT 和 LRR 结构域使用 SMART 预测，并将结构域标注在上方的黑色条中
Identical amino acids are shaded in medium grey. CARD, NACHT and LRR were predicted by using the SMART program, and these domains are indicated as black bars above the alignment

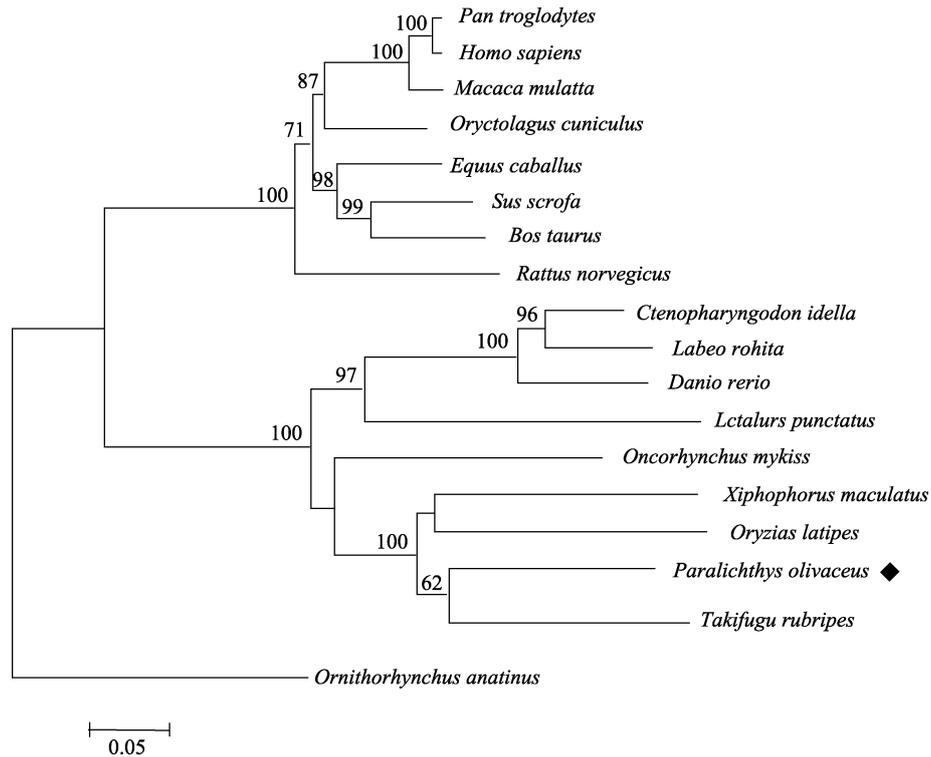


图 3 脊椎动物 *NOD2* 基因系统进化分析

Fig.3 The phylogenetic analysis of *NOD2* in different representative vertebrates based on their amino acid sequences

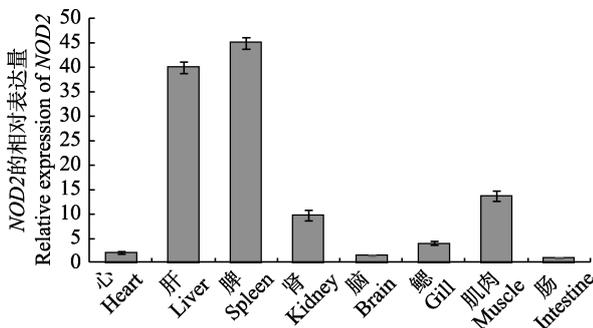


图 4 *PoNOD2* 基因在不同组织的 RT-qPCR 分析
Fig.4 Relative expression of *PoNOD2* in different tissues of Japanese flounder

β -actin 基因是定量分析的内参对照, 误差线代表平均值 \pm 标准误 ($n=3$)
 β -actin gene expression was used as internal control, vertical bars represent the Mean \pm SE ($n=3$)

2.6 免疫刺激牙鲆鳃细胞中 *PoNOD2* 的表达

为进一步探讨牙鲆 *NOD2* 在抗病原菌侵袭方面发挥的重要作用, 分别用 PBS、PGN、Poly I:C 和迟缓爱德华氏菌刺激牙鲆鳃细胞系, 并在 0~12 h 的不同时间点取样, 对牙鲆 *NOD2* 进行 qRT-PCR 分析, 结果表明, 不同的刺激均使牙鲆 *NOD2* 表达上调 (图 7)。

PBS 刺激时(图 7A), *PoNOD2* 在前 5 个时期表达无明显差异, 12 h 时有略微上调。PGN 刺激时(图 7B), *PoNOD2* 表达先升高后降低再升高。在 4 h 时, 达到一个峰值, 是 0 h 时的 10.9 倍, 在 12 h 时再次升高, 达到 0 h 的 8.74 倍。在 Poly I:C 刺激时(图 7C), *NOD2* 的表达在 1 h 时突然升高, 达到 0 h 的 4.4 倍, 在 2 h 时, *NOD2* 表达降低, 直到 8 h 时, 达到了最高点, 此时为 0 h 的 8.37 倍。迟缓爱德华氏菌刺激时(图 7D), *PoNOD2* 的表达在前 4 h 一直是高表达, 在 8 h 时降低, 12 h 时再次升高。

2.7 *PoNOD2* 抑制迟缓爱德华氏菌生长

实验结果见图 8, 在 6 h 时, 观察到 *PoNOD2* 对胞内菌抑制效果不明显, 与对照组相比, 没有显著性差异。然而, 随着时间推移到细菌侵染后 15 h, 迟缓爱德华氏菌在牙鲆鳃细胞内繁殖, 对照组胞内菌数目增加到 4.55×10^5 CFU/12 孔, 而实验组胞内菌数目为 2.86×10^5 CFU/12 孔, 相比对照组下降了 30%。

2.8 *PoNOD2* 调节免疫因子生成

基于获得了 *PoNOD2* 过表达的牙鲆细胞系, 检测了在 PGN 刺激 24 h 后 FG 细胞中促炎细胞因子的表达情况。结果显示(图 9), 相比转染 p-EGFP-C1 的

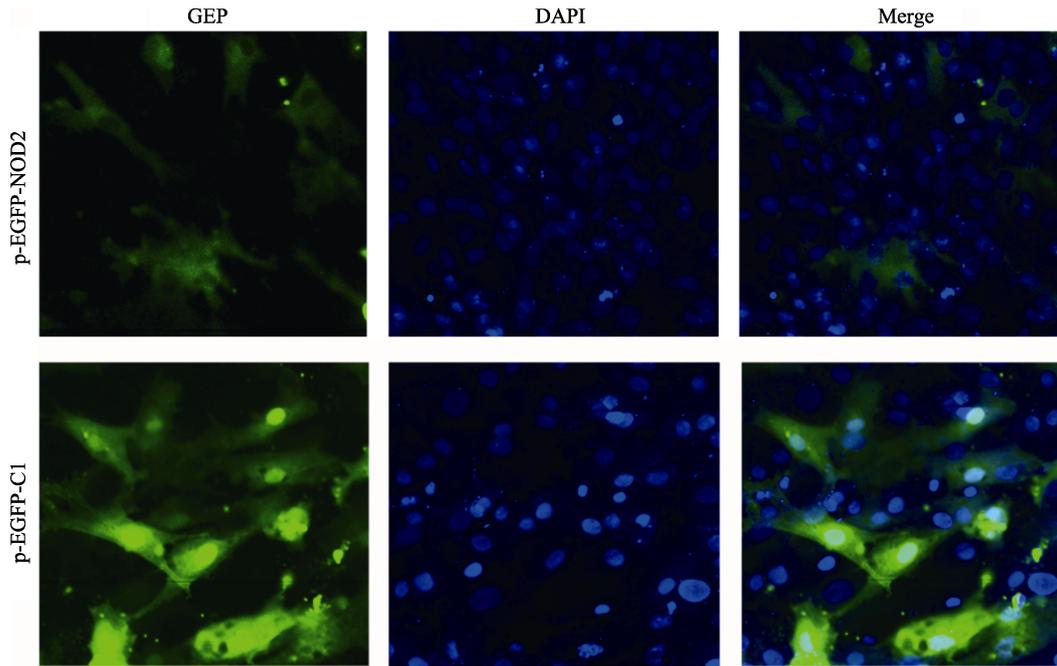


图 5 PoNOD2 蛋白的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of PoNOD2 in Japanese flounder FG cells

激光共聚焦显微镜下, *PoNOD2*(绿色荧光)在细胞质中,核 DNA 用 DAPI 染色, pEGFP-C1 用做阴性对照
Localization of PoNOD2 in FG cells under confocal microscope. PoNOD2 was mainly detected in cytoplasm. Nuclear DNA of the cells was counterstained with DAPI. The cells transfected with pEGFP-C1 were used as negative controls

对照组, *PoNOD2* 的过表达能明显上调 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的表达水平, 表达量分别高 11.6 倍、4.6 倍和 8.76 倍。

3 讨论

本研究结果显示, *PoNOD2* 蛋白具有 3 种典型结构域 CARD、NACHT 和 LRR, 蛋白质多重序列比对得知, 这 3 类结构域都相对保守, 其中 NACHT 保守性最高。由此可以推测, 牙鲆可能利用 *NOD2* 基因的 CARD、NACHT 和 LRR 结构域完成识别信号、启动免疫信号通路的功能(Zurek *et al*, 2012; Maharana *et al*, 2015)。

NOD2 广泛分布在哺乳动物和鱼类的各种组织中, 本研究利用 qRT-PCR 检测到 *PoNOD2* 在牙鲆各个组织广泛表达, 在脾脏中表达最高, 其次是肝脏。在印度鲷、草鱼中, 类似的组织表达研究显示, *NOD2* 广泛分布在各个组织, 印度鲷 *NOD2* 在肝脏中表达最高(Swain *et al*, 2013), 草鱼 *NOD2* 在肾脏中表达最高(Chen *et al*, 2010), 这种表达差异可能与鱼种类不同有关。肾脏是鱼类重要免疫器官, 在鱼类抵御外来病原菌入侵过程中最先产生免疫调节作用。鱼类脾的免疫功能仅次于肾, 同时, 承载着造血和免疫作用。肝脏是鱼类重要的解毒器官, 在鱼类维持生理平衡、抵

御异物感染中发挥重要作用。*PoNOD2* 在肝脏与脾中的高表达表明其具有重要的免疫功能。*PoNOD2* 在迟缓爱德华氏菌感染的牙鲆鳃、肾和脾中的定量表达结果显示, 在肾中 *PoNOD2* 随着迟缓爱德华氏菌的感染呈现先升高又降低再升高的趋势; 在脾和鳃中, *PoNOD2* 随着迟缓爱德华氏菌的侵染表达逐渐升高。*PoNOD2* 表达模式的不同可能与组织功能不同有关, 表明 *PoNOD2* 能够参与牙鲆抗迟缓爱德华氏菌感染的免疫反应, *NOD2* 具有抗胞内菌作用。

PGN 是革兰氏阳性菌和阴性菌细胞壁的重要组成部分, *NOD2* 能够特异识别 PGN 的降解产物胞壁酰二肽(MDP)(Girardin *et al*, 2003)。Poly I:C 是一种干扰素抑制剂, 作为双链 RNA 的类似物, 在实验中常被用来模拟病毒刺激(Fujimoto *et al*, 2004)。本研究结果表明, PGN、Poly I:C 和迟缓爱德华氏菌均能上调 *PoNOD2* 的表达, 但上调的程度和时间不同。PGN 与迟缓爱德华氏菌相比, 能够引起 *PoNOD2* 更大幅度的上调, 在 4 h 时, 是对照组表达量的 10 倍。PGN 是细菌细胞壁的组成成分, 能够被 *NOD2* 特异识别; 而迟缓爱德华氏菌刺激时, 除了激活 *NOD2* 信号通路, 还会引起其他一些受体基因的先免疫应答。因此, *PoNOD2* 表达上的差异可能与细胞应对专一刺激

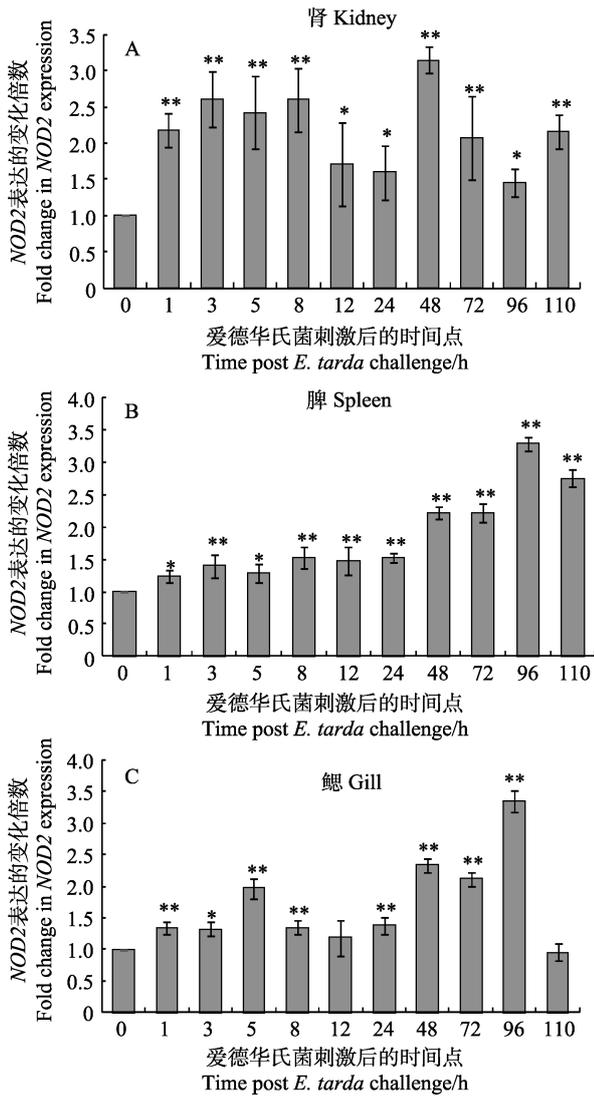


图 6 迟缓爱德华氏菌刺激下 *PoNOD2* 在牙鲆组织的表达
Fig.6 Expression profile of *PoNOD2* mRNA in kidney, spleen and gill of Japanese flounder following *E. tarda* challenges

β -actin 基因是定量分析的内参对照, 时间点 0 h 表达量用作参照样品。所有数据以平均值 \pm 标准误 ($n=4$)表示, 各个组之间的差异性用*表示($*P<0.05$; $**P<0.01$)

β -actin gene expression was used as internal control and the time point 0 h was used as reference sample. Vertical bars represent Mean \pm SE ($n=4$). Significant difference between *E. tarda*-challenged tissues and blank control (at 0 h) are indicated by asterisk ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$)

物和活菌的反应机制不同有关。而 PGN、迟缓爱德华氏菌与 Poly I:C 的不同, 可能由 *PoNOD2* 对病毒和细菌的识别机制不同导致。总之, 本研究发现, *PoNOD2* 的表达能够被细菌、病毒类似物以及细菌降解产物的刺激所激活, 表明 *PoNOD2* 在牙鲆免疫反应中发挥重要的作用。

哺乳动物中 *NOD2*-*RIPK2* 途径可以调节先天性免疫反应和控制细胞因子的产生, 并可以诱发适应性免疫应答来促进宿主抗微生物反应(Magalhaes *et al*, 2011)。以往在斑马鱼中的研究表明(Zou *et al*, 2016), *NOD2* 过表达并不能够起到抑制胞内迟缓爱德华氏菌繁殖的能力。为了探讨 *PoNOD2* 是否可以发挥与哺乳动物一样的效果, 本研究用过表达 *NOD2* 的牙鲆鳃细胞系进行迟缓爱德华氏菌侵染实验。实验结果显示, 在侵染 6 h 后, 过表达 *NOD2* 的实验组和对照组相比, 体内细菌数量没有显著性降低, 但在 15 h 时, 实验组相对对照组降低了 30%。这与哺乳动物中的研究结果相一致, 但与斑马鱼的研究结果不同。在斑马鱼研究中(Zou *et al*, 2016), 作者并没有进行 6 h 以后的跟踪实验。本研究认为, 牙鲆和斑马鱼实验结果的不同可能有 3 种原因: *PoNOD2* 作为一个胞内识别受体, 它通过识别胞内菌引起系列先天免疫反应, 该反应随着时间的延长, 抑菌效果逐渐增强; 牙鲆 *NOD2* 和斑马鱼 *NOD2* 在应对迟缓爱德华氏菌侵染过程中发挥的作用不同; 2 个实验所用的细胞系不同, 本实验用的是牙鲆鳃细胞系, 斑马鱼实验用的胚胎细胞系, 鳃是鱼类先天性免疫的重要器官, 鳃细胞系对免疫应答的表现可能比胚胎细胞系更加直观和清楚。

IL-1 β 和 *IL-6* 等白介素家族成员是细胞炎症反应中的重要因子(Scheller *et al*, 2011)。本研究利用 PGN 刺激转染 p-EGFP-*NOD2* 的牙鲆鳃细胞系, 探讨 *NOD2* 是否能够抑制或者激活这些细胞炎症因子的表达。结果表明, *PoNOD2* 过表达能够引起 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的表达上调。其中, *IL-1 β* 和 *IL-8* 的上调程度高于 *IL-6*, 这可能与 *PoNOD2* 对 3 种基因的调节作用不同有关。*PoNOD2* 过表达能够抑制迟缓爱德华氏菌在细胞内的增殖, 而 *PoNOD2* 过表达能够上调 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *IL-8* 等细胞炎症因子的表达。因此, *PoNOD2* 发挥抑菌作用可能通过上调炎症细胞因子的表达, 从而促进细胞炎症反应, 达到抑菌的目的。

本研究克隆了 *PoNOD2* 基因, 并分别研究了 *PoNOD2* 基因在成体鱼和细胞水平的表达特征, 研究结果表明, 该基因可能在牙鲆先天性免疫中起重要作用。同时, *PoNOD2* 过表达能够激活炎症细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-6* 和 *IL-8* 等的表达, 参与了牙鲆的免疫应答反应, 对胞内迟缓爱德华氏菌的感染起到抑制作用。本研究为今后更深入研究牙鲆细菌感染的分子机制及免疫应答机理提供了详实的数据, 奠定了理论基础。

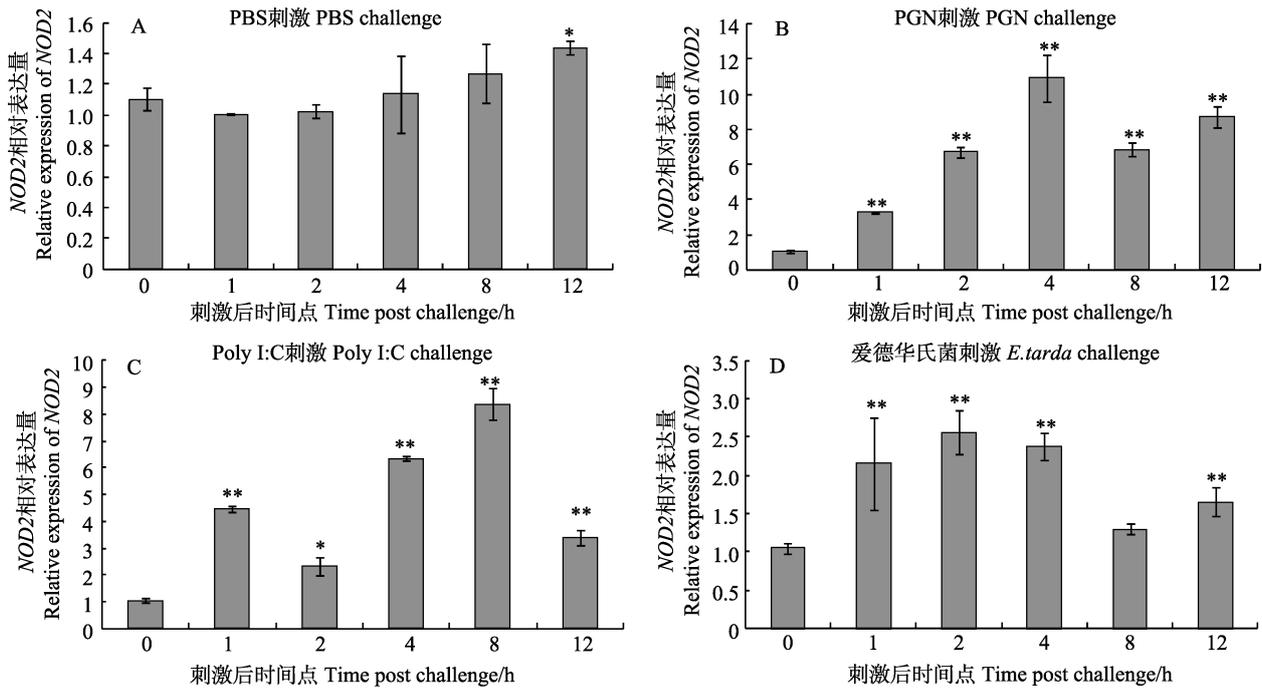


图7 *PoNOD2* 在免疫刺激牙鲆鳃细胞中的表达

Fig.7 Expression profiles of *PoNOD2* mRNA in Japanese flounder FG cells subjected under different stimuli

PoNOD2 的 mRNA 水平在不同刺激下的 FG 细胞的定量表达, 包括 PBS、PGN、Poly I: C 和 *Edwardsiella tarda*。
β-actin 基因表达用作内参对照, 时间点 0 h 用作参样品。误差线表示平均值±标准误(n=3)。

刺激组与空白对照(0 h)之间的显著差异由星号表示(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Quantitative expression profile of *PoNOD2* mRNA in FG cells following different challenges, including PBS, PGN, Poly I:C, and *E. tarda*. β-actin gene expression was used as internal control, and the time point 0 h was used as reference sample. Vertical bars represent Mean±SE ($n=3$). Significant difference between stimuli- or bacteria-challenged and blank control (at 0 h) are indicated by asterisk (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

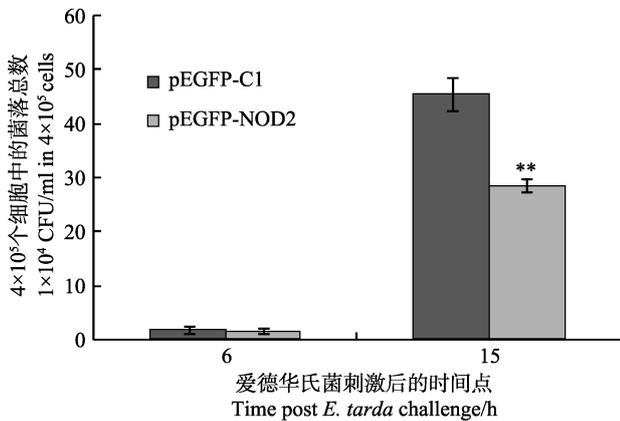


图8 *PoNOD2* 在牙鲆鳃细胞中的抗菌检测

Fig.8 Antibacterial assays of *PoNOD2* in Japanese flounder FG cells

误差线表示平均值±标准误($n=3$)。在 6 h 和 15 h 时, pEGFP-NOD2 组与 pEGFP-C1 组之间的显著差异由星号表示(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

The results were expressed as Mean±SE of three independent experiments, with each performed in triplicate. Significant difference between pEGFP-NOD2 group and pEGFP-C1 group at different time are indicated by asterisk (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

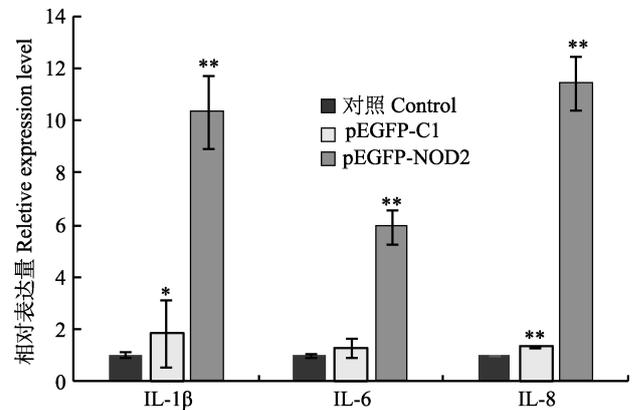


图9 NOD2 过表达对 PGN 刺激的 FG 细胞中促炎细胞因子的表达的影响

Fig.9 Effect of NOD2 overexpression on the expression of pro-inflammatory cytokines in PGN-stimulated Japanese flounder FG cells

误差线表示平均值±标准误 ($n=3$)。pEGFP-NOD2 与 pEGFP-C1 和对照组之间的显著差异由星号表示(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Vertical bars represent the Mean±SE ($n=3$). Significant difference between pEGFP-NOD2 and pEGFP-C1 and the control is indicated by asterisk (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

参 考 文 献

- Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, *et al.* Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(19): 12955–12958
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, *et al.* Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(9): 541–547
- Chang M, Wang T, Nie P, *et al.* Cloning of two rainbow trout nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) splice variants and functional characterization of the NOD2 effector domains. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(1): 118–127
- Chen WQ, Xu QQ, Chang MX. Molecular characterization and expression analysis of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 28(1): 18–29
- Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of Immunology*, 2009, 183(2): 792–796
- Fujimoto C, Nakagawa Y, Ohara K, *et al.* Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [Poly (I: C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *International Immunology*, 2004, 16(1): 55–63
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 8869–8872
- Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, *et al.* Immunoglobulin containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. *Fish and Shellfish Immunology*, 1991, 1(3): 173–185
- Inohara N, Nuñez G. NODs: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(5): 371–382
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 2002(20): 197–216
- Ling SH, Wang XH, Xie L, *et al.* Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology*, 2000, 146(1): 7–19
- Magalhaes JG, Lee J, Geddes K, *et al.* Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *European Journal of Immunology*, 2011, 41(5): 1445–1455
- Maharana J, Dehury B, Sahoo JR, *et al.* Structural and functional insights into CARDs of zebrafish (*Danio rerio*) NOD1 and NOD2, and their interaction with adaptor protein RIP2. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(8): 2324–2336
- McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(27): 16968–16975
- Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: A brief review. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(7): 1331–1344
- Navas TA, Baldwin DT, Stewart TA. RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(47): 33684–33690
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, *et al.* Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(7): 4812–4818
- Okuda J, Arikawa Y, Takeuchi Y, *et al.* Intracellular replication of *Edwardsiella tarda* in murine macrophage is dependent on the type III secretion system and induces an up-regulation of anti-apoptotic NF- κ B target genes protecting the macrophage from staurosporine-induced apoptosis. *Microbial Pathogenesis*, 2006, 41(6): 226–240
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, *et al.* The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(5): 878–888
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection and Immunity*, 2001, 69(9): 5689–5697
- Swain B, Basu M, Samanta M. NOD1 and NOD2 receptors in mrigal (*Cirrhinus mrigala*): Inductive expression and downstream signalling in ligand stimulation and bacterial infections. *Journal of Biosciences*, 2013, 38(3): 533–548
- Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells*, 2001, 6(9): 733–742
- Zou PF, Chang MX, Li Y, *et al.* NOD2 in zebrafish functions in antibacterial and also antiviral responses *via* NF- κ B, and also MDA5, RIG-I and MAVS. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 55: 173–185
- Zurek B, Proell M, Wagner RN, *et al.* Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation. *Innate Immunity*, 2012, 18(1): 100–111

Expression Analysis and Functional Characterization of *NOD2* in the Resistance of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Edwardsiella tarda* Infection

CAO Dandan, LIU Jinxiang, WANG Zhigang, ZHANG Quanqi, QI Jie, WANG Xubo, YU Haiyang^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences,
Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract The innate immune system acts as the first defense against invading pathogens through three classes of pattern recognition receptors (PRRs), which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), including the Toll-like receptors (TLRs), RIG-like receptors (RLRs), and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs). The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors are a family of innate immune receptors that link cytosolic sensing of microbes and danger stimuli to activate immune responses. As a member of the NOD-like receptor family, NOD2 can recognize bacterial peptidoglycan and activate immune responses via nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). In the present study, the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NOD2 (*PoNOD2*) was identified by searching the transcriptome sequence of Japanese flounder based on the available *NOD2* cDNA sequences of other fishes. The complete open reading frame (ORF) of *PoNOD2* is 2964 bp and encodes a polypeptide of 988 amino acids. The gene *PoNOD2* is composed of three main domains: an N-terminal domain containing two adjacent CARDs, a central NACHT domain, and a multiple C-terminal LRRs. The phylogenetic tree analysis suggests that the gene *PoNOD2* is closely related to that of the Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*). Tissue expression analysis by qRT-PCR showed that the gene *PoNOD2* is constitutively expressed in all the examined tissues, predominantly in the spleen and liver. Real-time PCR showed that the infection of *Edwardsiella tarda* can significantly upregulate the expression of *PoNOD2* in the tissue of Japanese flounder. In vitro immune stimulation experiments showed that *PoNOD2* expression could be upregulated by peptidoglycan, polyinosinic: polycytidylic acid, and *E. tarda* infection. Subcellular localization of the *PoNOD2* protein is in the cytoplasm of the gill cells of flounder. When the flounder gill (FG) cells were infected by *E. tarda*, the overexpression of *PoNOD2* can inhibit the bacterial replication and upregulate the transcription of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and IL-8. These results suggest that *PoNOD2* plays a key role in the resistance of *P. olivaceus* to *E. tarda* infection and in the modulation of immune responses.

Key words Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); PRR; *NOD2*; *Edwardsiella tarda*; FG cells

① Corresponding author: YU Haiyang, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn